

法:应用 PhosphoSNP 2.0、Scansite 3 及 GPS 2.1 软件对 R1628P 位点进行分析,预测 R1628P 突变导致其相邻 S1627 位点成为与 PD 发病密切相关的 CDK5 磷酸化靶点的可能性。(2)细胞与分子生物学方法:野生型 LRRK2 和 R1628P 突变体,单独或与 CDK5 联合转染至细胞,免疫沉淀 LRRK2 蛋白,观察 LRRK2 与 CDK5 结合能力,并应用体外激酶实验检测 LRRK2 激酶活性;再将其质粒转染至原代培养神经元中,应用单细胞计数检测 H_2O_2 处理后神经元死亡情况。

【结果】 通过荟萃分析,R1628P 在汉族人群及非汉族人群中呈现典型的差异性分布,为中国汉族人群所特有,且 R1628P 在不同汉族人亚群中的致病危险度具有明显差别。(1)生物信息学方法提示 R1628P 突变导致其相邻 S1627 位点成为 CDK5 潜在的磷酸化靶点,是典型的磷酸化相关 SNP 的 Type II(+)位点。(2)细胞与分子生物学方法证实 LRRK2 的 R1628P 位点突变增强 LRRK2 与 CDK5 蛋白的结合能力;与野生型 LRRK2 相比,R1628P 突变体的激酶活性无明显上调,但与 CDK5 共转可显著上调 R1628P 突变体的激酶活性,并且转染 R1628P 突变体的神经元对损伤更敏感;但 CDK5 敲除小鼠神经元中转染野生型及 R1628P 突变体的神经元无差别。

【结论】 本研究证实 LRRK2 基因的 R1628P 多态性在汉族人群及非汉族人群中呈现典型的差异性分布,为中国汉族人群所特有,并在不同汉族人亚群中的致病危险度具有明显差别;R1628P 的致病分子机理为:R1628P 突变导致其相邻 S1627 位点成为 CDK5 潜在的磷酸化靶点,在老年应激导致的 CDK5 活性上调时,R1628P 突变提供 CDK5“二次打击”的靶点,加速 PD 发病。本研究为探索 PD 发病分子机制提供新的研究线索,同时为治疗 PD 提供新的药物靶点。

关键词: R1628P 突变;CDK5;PhosSNP;帕金森病

A-S2-16

突变亨廷顿蛋白通过裂解钙反应性反式激活子 CREST 产生细胞毒性

赵黎明¹,漆艺玮²,丁胜男²,龙雪峰²;指导教师:李和,彭挺

1. 华中科技大学同济医学院 2010 级临床医学八年制

2. 华中科技大学同济医学院 2011 级临床医学八年制

【目的】 亨廷顿病(HD)基因突变后编码的突变亨廷顿蛋白(mHtt)通过干扰神经元的细胞周期,造成神经元死亡;钙反应性反式激活子(CREST)可促进神经元分化发育。本项目研究 mHtt 是否通过影响 CREST 而产生细胞毒性。

【方法】 应用免疫印迹、RT-PCR 检测 HD 转基因小鼠(R6/2 小鼠)和转染表达 mHtt 的小鼠成神经瘤细胞(N2a 细胞)中 CREST 的蛋白和 mRNA 水平,应用生物信息学方法和缺失突变实验分析检测 CREST 中可能酶解位点,应用台盼蓝和 PI 染色检测细胞活力,以无血清培养进行神经细胞分化诱导,以 N2a 细胞突起生长长度反映其分化能力。

【结果】 在 HD 转基因小鼠大脑皮质、纹状体、海马内及转染表达 mHtt 的 N2a 细胞内,CREST 蛋白水平明显降低,但其 mRNA 水平无显著改变,提示 mHtt 不影响 CREST 的转录表达,但可引起 CREST 翻译后水平的改变。在全长 CREST(55 kDa)蛋白水平降低的同时,一个分子量在 35 kDa 左右的 CREST 裂解片段水平显著增加。生物信息学分析发现,CREST 分子中不存在半胱氨酸蛋白酶(caspase)酶切位点,但存在多个可能的钙蛋白酶(calpain)酶切位点。在表达 mHtt 的 N2a 细胞用 calpain 活性抑制剂 calpeptin 处理后,35 kDa-CREST 片段的产生减少,而全长 CREST 水平的降低被抑制。分别用 HA 和 Flag 标签对全长 CREST 蛋白的氨基端和羧基端进行标记,构建了 HA-CREST-flag 质粒,与表达 mHtt 的质粒共转 N2a 细胞后,发现 35 kDa-CREST 片段可以被 Flag 抗体检测到,而不能被 HA 抗体检测到;缺失 132-139aa 的 CREST 在表达 mHtt 的细胞中产生与对照细胞水平相近

的 35 kDa 羧基末端片段,而其他缺失钙蛋白酶可能裂解位点的 CREST 在表达 mHtt 的细胞中仍产生高水平的 35 kDa 羧基末端片段。因此,被 mHtt 激活的钙蛋白酶主要在 CREST 的 132-139aa 部位对其进行裂解。对细胞活力的分析发现,在转染表达 mHtt 的 N2a 细胞中,过表达 CREST 可以显著降低台盼蓝和 PI 染色阳性的死细胞比率;过表达 CREST 还可显著纠正 mHtt 对 N2a 细胞突起生长的抑制。细胞活力分析和突起生长检测结果提示,mHtt 对细胞的毒性和对分化的抑制与其降低 CREST 蛋白水平有关。

【结论】 mHtt 在 CREST 132-139aa 处通过钙蛋白酶相关的蛋白裂解方式促进 CREST 的降解,引起 CREST 促神经元分化功能的降低而产生细胞毒性。该研究进一步揭示了 HD 的病理学机制,并为探索治疗 HD 的方法提供了新的线索。

关键词: 亨廷顿病;亨廷顿蛋白;钙反应性反式激活子;钙蛋白酶;神经元分化

A-S2-17

ATP 对大鼠 BMSCs 的死亡诱导作用及其机制的探究

许哲远¹,李国勇²,刘娜威²,谭巧云²,马小桐³;指导教师:罗娟

1. 华中科技大学同济医学院 2010 级临床医学八年制

2. 华中科技大学同济医学院 2010 级中德实验班

3. 华中科技大学同济医学院 2011 级临床医学八年制

【目的】 骨髓间充质干细胞(BMSCs)由于其来源方便、易于分离培养、具有多分化潜能、可自体移植等优点,在组织损伤修复领域受到了广泛关注。但早期大量的移植后细胞死亡是阻碍其发展的主要障碍之一。近年来研究表明局部微环境高浓度的 ATP 可能是导致细胞移植后死亡的因素之一。本课题将探究体外高浓度(> 1 mmol/L)的 ATP 对大鼠 BMSCs 的死亡诱导作用及其是否与 P2X7 受体(P2X7R)和(或)Pannexin-1 的激活有关,为减少 BMSCs 移植后死亡提供一条新的思路,以促进其在组织损伤修复中的应用。

【方法】 (1)细胞凋亡检测(CCK 试剂盒; caspase-3 蛋白检测; Annexin V/PI 试剂盒);(2)染料摄取实验观察细胞膜孔隙形成以及激光共聚焦显微镜动态监测细胞内钙的变化;(3)细胞免疫荧光组织化学技术。

【结果】 (1)体外高浓度的 ATP 诱导大鼠 BMSCs 死亡;高浓度 ATP (5、10 mmol/L) 处理大鼠 BMSCs 24 h 后细胞出现明显凋亡。蛋白质印迹结果显示 10 mmol/L ATP 处理 24、48 h 后,细胞内 caspase-3 表达明显增加。(2)高浓度 ATP 诱导的大鼠 BMSCs 死亡的机制可能与细胞膜孔隙的形成和(或)细胞内钙超载有关;加入 10 mmol/L ATP 后,荧光显微镜观察显示细胞对 Ethidium Bromide 染料的摄取明显增加,提示细胞膜上孔隙形成;通过激光共聚焦显微镜监测 ATP 干预后细胞内钙离子浓度的变化,结果显示 ATP 处理组细胞内 Fluo-4 荧光亮度随时间逐渐增强。这些数据提示高浓度 ATP 诱导的 BMSCs 死亡的机制可能与细胞膜孔隙的形成和(或)细胞内钙超载有关。(3)Pannexin-1 半通道蛋白参与 ATP 诱导的 BMSCs 细胞毒性效应;细胞免疫荧光染色显示大鼠 BMSCs 有 Pannexin-1 表达。Pannexin-1 的特异性阻断剂 CBX 可以部分阻断 ATP 诱导的 BMSCs 的死亡。(4)大鼠 BMSCs 表达 P2X7R;细胞免疫荧光染色结果显示大鼠 BMSCs 表达 P2X7R,但 P2X7R 的阻断剂 oxATP 不能逆转 ATP 诱导的细胞毒性作用。这可能是由于 oxATP 并不能特异性阻断 P2X7R。下一步我们计划用特异性 siRNA 使大鼠 BMSCs 上 P2X7R 表达下调再进一步观察。

【结论】 高浓度的 ATP 诱导大鼠 BMSCs 死亡,其机制可能与细胞膜孔隙的形成和(或)细胞内钙超载有关;Pannexin-1 参与了 ATP 诱导的大鼠 BMSCs 死亡作用。

关键词: ATP;BMSC;细胞死亡;Pannexin-1;P2X7R